

О.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.І. Цимбалюк

Вплив пізньої трансплантації фетальної нервової тканини на цитоархітектоніку гіпокампа у віддаленому періоді після транзиторної глобальної ішемії головного мозку щурів

Досліджено вплив трансплантації фетальної нервової тканини (ФНТ) на процеси відновлення структури гіпокампа щурів після ішемії. Транзиторну глобальну ішемію (ТГІ) головного мозку у щурів віком 13,2 міс \pm 2,4 міс викликали за допомогою 20-хвилинної чотирисудинної оклюзії. Суспензію ФНТ отримували з СА1-зони та зародкової зубчастої звивини гіпокампів плодів щурів 18–19-ї доби ембріонального розвитку. ФНТ трансплантували стереотаксично у СА1-зону гіпокампа тварин через 30 діб після ТГІ. Лінійну щільність пірамідальних клітин, ширину променистого шару СА1-зони, морфологію зубчастої звивини та СА4-зони вивчали на світлооптичному рівні у зрізах гіпокампів через 2, 4 та 7 міс після ТГІ і через 1, 3 та 6 міс після трансплантації ФНТ. Встановлено, що пізня трансплантація ФНТ достовірно прискорює відновлення цитоархітектоніки гіпокампа впродовж тривалого періоду після ТГІ головного мозку щурів.

Ключові слова: фетальна нервова тканина, глобальна ішемія головного мозку, стереотаксична трансплантація, гіпокамп.

ВСТУП

Широкий спектр неврологічних захворювань характеризується розладами процесів пам'яті та навчання, які об'єднуються поняттям “когнітивна функція центральної нервової системи”. До таких захворювань, зокрема, належать стареча деменція, хвороба Альцгеймера, стани після порушень мозкового кровообігу, зупинок серцевої діяльності тощо [8, 9]. Багато дослідників довели провідну роль парагіпокампально-гіпокампальної системи, що входить до складу лімбічної системи переднього мозку у забезпеченні когнітивної функції [5, 20, 26]. Встановлено, що саме пірамідальні клітини СА1-зони гіпокампа найменш стійкі до гіпоксично-ішемічного впливу, а поширеність ураження цієї зони корелює зі ступенем когнітивної дисфункції [17, 18, 28].

© О.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.І. Цимбалюк

Більшість експериментальних робіт у цьому напрямку виконана на щурах, у яких еквівалентом пам'яті та навчання є процес вироблення та утримання тих чи інших поведінкових реакцій. Особливого поширення у моделюванні когнітивних розладів постішемічного типу набула модель транзиторної глобальної ішемії (ТГІ) головного мозку щурів при чотирисудинній оклюзії [17]. Показано, що тимчасове припинення кровопостачання головного мозку впродовж 20 хв призводить до незворотного ураження 85–90 % пірамідальних клітин переважно у СА1-зоні гіпокампа протягом наступних 72 год [18]. Аналогічні дані отримували у разі двобічної оклюзії сонних артерій у піщанок [13, 14] та ішемічного ураження головного мозку приматів [30]. Діаметрально протилежні зміни відбуваються в іншій частині гіпокампа –

зубчастій звивині. Встановлено, що транзиторна ішемія головного мозку стимулює нейрогенез у цій ділянці внаслідок проліферації нейральних прогеніторів у субгранулярній зоні зубчастої звивини під впливом специфічних факторів росту, що екскретуються ендотеліоцитами локального мікросудинного оточення [13, 30].

У зв'язку з ключовою роллю гіпокампа у процесах консолідації та відтворення пам'яті, актуальним є пошук способів відновлення його структури та функції, зокрема найбільш уразливої СА1-зони. Особливої уваги заслуговує нейротрансплантація, в тому числі з використанням гомотопічної ембріональної нервової тканини, клітин «умовно безсмертних» ліній, ембріональних нервових стовбурових клітин/прогеніторів, або аутологічних стовбурових клітин – похідних стромальних клітин кісткового мозку [10, 12, 15, 22, 25, 27]. Після такої трансплантації спостерігали міграцію та подальшу диференціацію введених клітин у нейрони з утворенням синаптичних контактів з нейронами реципієнта як локально, в зоні трансплантації, так і з відповідними структурами контралатеральної півкулі головного мозку, що забезпечувало позитивний терапевтичний ефект [3, 10, 12, 27]. У більшості робіт трансплантацію проводили у ранній (7–14-та доба) період після травматичного чи ішемічного пошкодження головного мозку експериментальних тварин. Відомо, що в цей період мікрооточення в зоні ураження потенційного реципієнта є найбільш сприйнятливим до інтеграції трансплантата [6]. Однак перспектива клінічного застосування нейротрансплантації змушує наближати експериментальні умови до реальних. Адже часто після початку захворювання проходить тривалий час, як це спостерігається при нейродегенеративних захворюваннях і цереброваскулярній патології. При цьому в зоні ураження розвиваються незворотні процеси у вигляді формування

гліального рубця, суттєвого погіршення васкуляризації, що несприятливо відображається на міграції трансплантованих клітин до ділянки пошкодження та їх інтеграції в нейрональні ланцюги реципієнта [25]. Відомо також, що пластичність головного мозку експериментальних тварин знижується з віком [29], а, отже, і зменшується здатність до спонтанної регенерації.

Мета нашої роботи полягала в оцінці впливу більш пізньої (через 30 діб після ішемічного ураження головного мозку) трансплантації фетальної нервової тканини (ТФНТ) на структуру гіпокампа дорослих лабораторних щурів у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс). Для ТФНТ використовували суспензію клітин СА1-зони та зубчастої звивини гіпокампа фетального мозку щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 151 самцю білих лабораторних щурів віком $13,2 \text{ міс} \pm 2,4 \text{ міс}$ і масою $417 \text{ г} \pm 34 \text{ г}$, з них 5 становили інтактний віварійний контроль. Щурів утримували по 4–6 особин у пластикових вольєрах в умовах віварію зі світловим режимом день–ніч при середній температурі $24 \text{ }^\circ\text{C}$, годували стандартним комбікормом та поїли водою без обмежень. Перед оперативними втручаннями тварин позбавляли їжі строком на 8 год. Усі маніпуляції виконували згідно з Законом України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також з Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою, та відповідно до принципів біоетики і норм біологічної безпеки.

ТГГ головного мозку викликали у тварин під внутрішньоочеревинним наркозом кетаміном (Каліпсовет плюс, ЗАТ „Біолік”, Україна) у дозі 70 мг/кг і ксилазином (Хула,

“Interchemie”, Нідерланди) у дозі 7,5 мг/кг, за допомогою чотирисудинної оклюзії [17]. У 65 % тварин спостерігали втрату установочного рефлексу при збереженні корнеального, що свідчило про достатнє кровопостачання стовбура головного мозку.

Для отримання суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів відбирали вагітних самиць на 18–19-ту добу після спарювання. Під інтраперитонеальним наркозом кетаміном у поєднанні з ксилазином плоди виділяли з матки та плідних міхурів. Після цього плоди відділяли від плацент і переносили у розчин Хенкса, що не містив Ca^{2+} та Mg^{2+} («Sigma», США), а також 0,6 % глюкози, 10 ммоль/л HEPES. Потім плоди декапітували, відокремлювали гемісфери головного мозку, з яких поетапно виділяли CA1-зони та зародкові зубчасті звивини гіпокампа.

Отримані фрагменти тканини піддавали механічній дисоціації піпетками Пастера змінних діаметрів у об'ємі 2,0 мл. Життєздатність клітин суспензії оцінювали, підраховуючи кількість живих клітин у камері Горяєва після забарвлення розчином трипанового синього, її значення становило $70 \% \pm 8 \%$. Перед введенням суспензію ресуспендували до концентрації 10 000 живих клітин/мкл.

Стереотаксичну ТФНТ проводили через 4 тиж після ішемії. Під внутрішньоочеревинним наркозом, як описано вище, голову тварини фіксували у модифікованому стереотаксичному апараті СЕЖ-3 в положенні flat skull. Усі стереотаксичні маніпуляції виконували з використанням координат введення за атласом [16]. Стереотаксичну ТФНТ проводили в 4 точки (в міліметрах): AP (–4,3 від брегми); L ($\pm 2,0$), V (2,5) і AP (–5,3 від брегми); L ($\pm 3,5$), V (3,0). За допомогою скляного капіляра діаметром 0,3 мм, з'єданого з мікроін'єктором, протягом 3 хв у кожену точку вводили 10 мкл суспензії (100 000 клітин), для дифузії трансплантата капіляр залишали

у каналі введення на 10 хв.

ТГІ головного мозку викликали у 146 щурів методом чотирисудинної оклюзії. Інтраоклюзійна летальність становила 35 % (51 тварина), ще 5 тварин померли в ранньому післяопераційному періоді (7 діб) внаслідок генералізованого судомного синдрому. Щурів, які вижили протягом 4 тиж після ТГІ (90 тварин), розділили на 6 груп по 15 щурів у кожній, 45 тваринам виконували стереотаксичну ТФНТ. Інші 3 групи (45 тварин) були постішемичним контролем. Протягом 2–7 міс спостереження загинули ще 13 щурів (8 після ішемії, 5 після трансплантації). Тварин після ішемії виводили з експерименту через 2 міс (група ПІ1, n=14), 4 міс (група ПІ2, n=12) та 7 міс (група ПІ3, n=11) після оклюзії. Подібним чином виводили і тварин після трансплантації (із урахуванням трансплантації в 4 тиж) – через 1 міс (група ПТ1, n=15), 3 міс (група ПТ2, n=13) та 6 міс (група ПТ3, n=12).

Для аналізу цитоархітекτονіки гіпокампа забір матеріалу проводили у тварин під інгаляційним ефірним наркозом. Щурів декапітували, мозок фіксували у охолодженому 4%-му розчині параформальдегіду (ПА) на 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,4. Виділяли гіпокампи, які заключали у парафін, і депарафіновані зрізи завтовшки 7 мкм забарвлювали розчином на основі 0,1 М фосфатного буфера, який містив 1 % толуїдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрію.

Реакцію астроглії вивчали імуногістохімічним методом з використанням антитіл до гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ), який є специфічним маркером астроцитів. Для цих досліджень депарафіновані зрізи гіпокампа мітили поліклональними кролячими антитілами, що специфічні до ГФКБ (1:500) («ДАКО», Данія), при 4 °С протягом 20 год і 12 год зі вторинними антикролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Для візуалізації

імуногістохімічного забарвлення використовували розчин діамінобензидину з додаванням 0,03%-го розчину перекису водню. Зрізи дофарбовували розчином на основі 0,1 моль/л фосфатного буфера, як описано вище. Після забарвлення зрізи дегідратували і заключали у полістирол («Permount», США).

Забарвлені зрізи гіпокампа вивчали за допомогою світлового мікроскопа XSP-139A-TP з цифровою камерою Canon Power Shot G-6 («NNJOI Co.Ltd», Японія–Китай). Під час подальшого морфометричного аналізу на мікрофотографіях при збільшенні в 200 крат підраховували лінійну щільність інтактних пірамідальних клітин на 1 мм довжини CA1-зони гіпокампа та ширину променистого шару у мікрометрах.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення XLSTAT 2009.4.06 («Addinsoft», США). Нормальність розподілу всіх рядів отриманих результатів перевіряли з використанням тесту Шапіро–Уїлка. Розподіл значень лінійної щільності у групах ПІ1 та ПТ1 не відповідав вимогам нормального, тому ці параметри для всіх груп наведено у вигляді «медіана [I квартиль; III квартиль]». Значення лінійної щільності порівнювали за допомогою критерію U Манна–Уїтні. Розподіл значень ширини променистого шару у групах, де його вимірювання було можливим, задовольняв вимоги нормального розподілу. Тому порівняння її значень, наведених у вигляді середнє \pm стандартне відхилення (SD), проводили з використанням критерію t Стьюдента. Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження мікроскопічної будови гіпокампа інтактних (контроль) тварин наведено на рис. 1, а, де чітко видно зони та шари, які описані в літературі [1,

7]. Так, у власне гіпокампі диференціювали зону CA1 із характерним для неї поділом на шари. Використана методика забарвлення давала змогу розрізнити в CA1-зоні *alveus*, утворений аксонами пірамідальних клітин; *stratum oriens* (висхідний шар) – базальними дендритами пірамідальних клітин; *stratum pyramidale* (пірамідальний шар), що містить тіла пірамідальних клітин; *stratum radiatum* (променистий шар), утворений нерозгалуженими волокнами апікальних дендритів; і *stratum lacunosum-moleculare* (лакунозно-молекулярний шар) – розгалуженими частинами та тонкими закінченнями апікальних дендритів пірамідальних клітин.

Нами встановлено, що пірамідальний шар складався із тіл нейронів, компактно розташованих у 3–5 рядів (див. рис. 1, б). Клітини містили оточене тонким обідком гіперхромної цитоплазми велике округле світле ядро, в якому чітко розрізнялося ядрце. Медіальну межу CA1-зони визначали за шириною пірамідального шару та наявністю променистого шару, його зникнення відповідало переходу в *subiculum* [7, 19]. Латеральною межею був початок зони CA3, що містить візуально більші пірамідальні клітини [19]. Лінійна щільність пірамідальних клітин CA1-зони становила 198 [182; 208] мм^{-1} . Променистий шар складався з радіально орієнтованих рівнобіжних апікальних дендритів, його ширина становила 682 ± 36 мкм. Результати отримані при морфометричному аналізі 47 полів зору.

Зубчаста звивина складалась із внутрішнього гранулярного та зовнішнього молекулярного шарів, взаємно розташованих V-подібно, у вигляді двох прямих «плечей», що обмежували ворота, в яких розташована CA4-зона гіпокампа. Гранулярний шар містив компактно розташовані у 4–6 шарів гранулярні клітини, морфологічно подібні до пірамідальних клітин CA1-зони, однак дещо менших розмірів.

Група III, 2 міс після ТПІ. Виявлені нами зміни в пірамідальному шарі СА1-зони суттєво варіювали в сенсі більшої або меншої кількості нефагоцитованих залишків пірамідальних клітин. На частині зрізів гіпокампа виявлено повну дегенерацію пірамідального шару із утворенням залишкових порожнин та поодиноких без'ядерних, різко гіперхромних компактних тіл нейронів, від яких місцями відходили теж гіперхромні короткі базальні дендрити (див.

рис. 1,в). На інших зрізах дегенерація СА1-зони мала вигляд моношару описаних гіперхромних тіл із дещо довшими дендритами. Лінійна щільність незмінених пірамідальних клітин становила $4 [3; 9] \text{ мм}^{-1}$. Променистий шар СА1-зони втратив притаманну йому будову, структура його стала гомогенною, а по всій довжині шару видно мікровакуолізацію, тому його морфометричний аналіз не проводили. В усіх випадках спостерігали інтенсивну інфільт-

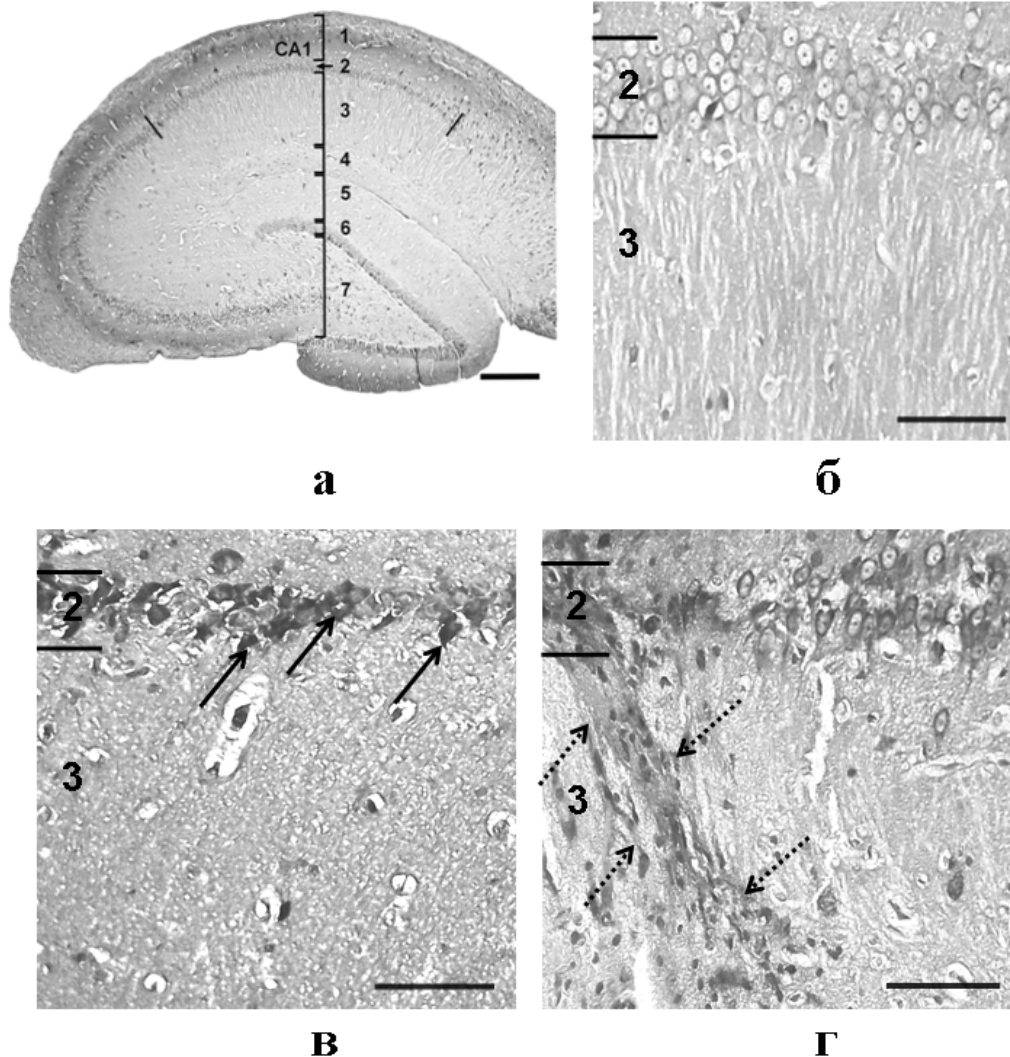


Рис. 1. Структура гіпокампа: а – інтактної тварини, СА1-зона позначена радіальними рисками; б-г – СА1-зона гіпокампа: б – віварійний контроль, в – 2 міс після ішемії, г – 1 міс після трансплантації. 1 – alveus і висхідний шар, 2 – пірамідальний шар, 3 – променистий шар, 4 – лакунозно-молекулярний шар, 5 – молекулярний шар зубчастої звивини, 6 – гранулярний шар зубчастої звивини, 7 – ворота зубчастої звивини. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Пунктирними стрілками позначений гліально-фіброзний рубець. Шкала: а – 500 мкм, б-г – 50 мкм

рацію клітинами мікроглії пірамідального та променистого шарів СА1-зони. Цитоархітектоніка СА3-зони виглядала практично незміненою.

Зміни зубчастої звивини спостерігали переважно у внутрішньому, прилеглому до СА1-зони, плечі. Вони полягали у зменшенні в гранулярному шарі кількості рядів клітин, що супроводжувалось анізоцитозом з деяким збільшенням розміру частини клітин при збереженні типової нейрональної морфології. Будова зовнішнього плеча залишалась майже інтактною. У воротах зубчастої звивини виявлено повну дегенерацію пірамідальних клітин СА4-зони.

Група ПТ1, 1 міс після ТФНТ. На тлі вищеописаних змін пірамідального шару СА1-зони у тварин групи ПТ1, у щурів групи ПТ1 виявляли відносно більшу лінійну щільність інтактних пірамідальних клітин – 23 [13; 49] мм⁻¹ (див. рис. 1,г). При цьому власне зона трансплантації зазнала трансформації у вигляді формування гліально-фіброзного рубця, навколо якого скупчувалися клітини з морфологією, характерною для пірамідальних нейронів. У променистому шарі на тлі практично повної гомогенізації та мікровакуолізації спостерігали поодинокі ділянки нормальної волокнистої будови. Вони розташовувалися безпосередньо поруч з пірамідальним шаром, який містив морфологічно нормальні нейрони. З огляду на невелику кількість таких ділянок морфометричний аналіз променистого шару також не проводили.

У більшості тварин після трансплантації кількість рядів клітин у гранулярному шарі внутрішнього плеча зростала до 9–10 при збереженні характерної морфології нейронів. Лише у однієї тварини виявили спустошення гранулярного шару внутрішнього плеча та зменшення кількості клітин у зовнішньому плечі. Жодних ознак дегенерації пірамідального шару СА4-зони у воротах зубчастої фасції не виявляли.

Група ПТ2, 4 міс після ТГТ. У пірамі-

дальному шарі СА1-зони виявляли як поодинокі гіперхромні компактизовані некротичні тіла нейронів, так і морфологічно нормальні пірамідальні клітини з лінійною щільністю 87 [72; 98] мм⁻¹ (рис. 2,а). Розташування пірамідальних нейронів в один, і лише місцями в два ряди, хоч і нагадувало пірамідальний шар контрольних тварин, однак було досить хаотичним. Променистий шар візуалізувався значно чіткіше, ніж у тварин групи ПТ1, але порівняно з контрольними тваринами був істотно більш розрідженим. Характерну рівнобіжність апікальних дендритів спостерігали рідко, переважно їхні волокна розташовані під більшим чи меншим кутом одне до одного. Мікровакуолізована частина променистого шару менша, ніж у тварин групи ПТ1, і зміщена до лакунозно-молекулярного шару. Ширина чітко диференційованого променистого шару становила 390 мкм ± 59 мкм (результати отримано при морфометричному аналізі 31 поля зору). Суттєво меншою також була і мікрогліальна інфільтрація променистого та пірамідного шарів гіпокампа.

При аналізі зубчастої звивини у гранулярному шарі як зовнішнього, так і внутрішнього плечей спостерігали гіперхромні некротизовані тіла нейронів. Проте, якщо у зовнішньому плечі також виявляли і масивний перицелюлярний набряк навколо гранулярних клітин із компактизацією їхнього ядра, то у внутрішньому плечі більшість таких клітин мала незмінену морфологію. У пірамідальному шарі СА4-зони відмічали виражену дегенерацію при наявності лише поодиноких інтактних нейронів.

Група ПТ2, 3 міс після ТФНТ. Пірамідальний шар СА1-зони складався із чітко диференційованих одного-двох рядів нейронів з лінійною щільністю 132 [112; 154] мм⁻¹ (див. рис. 2,в). Некротизованих тіл нейронів не виявлено. У місці введення трансплантата спостерігали гліально-

рубцеві зміни, як описано для групи ПТ1. Власне зона введення капіляра мікроін'єктора не містила пірамідальних клітин, але вони розташовувалися навколо цієї зони. Променистий шар зберігав виражені ознаки розрідження та мікровакуолізації, ширина чітко диференційованого шару з характерною радіальною будовою становила $535 \text{ мкм} \pm 73 \text{ мкм}$ (70 полів зору). Мікрогліальна інфільтрація порівняно з групами ПІ1 і ПТ1 була значно меншою.

У зубчастій звивині спостерігали як збільшення кількості рядів гранулярного шару внутрішнього плеча, так і його спустошення. У воротах зубчастої звивини

виявляли незмінені пірамідальні клітини СА4-зони.

При вивченні зрізів гіпокампа, забарвлених поліклональними антитілами до ГФКБ, виявляли інтенсивну проліферацію астроцитів переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини з поширенням її в ділянку введення трансплантата.

Група ПІ3, 7 міс після ТПІ. Пірамідальні нейрони в СА1-зоні гіпокампа розташовані у 2–3 ряди з лінійною щільністю $134 [117; 154] \text{ мм}^{-1}$ (див. рис. 2,б). Нейропіль, зокрема в променистому шарі, містив достатньо обширні ділянки мікровакуолізації ближче до лакунозно-молекулярного

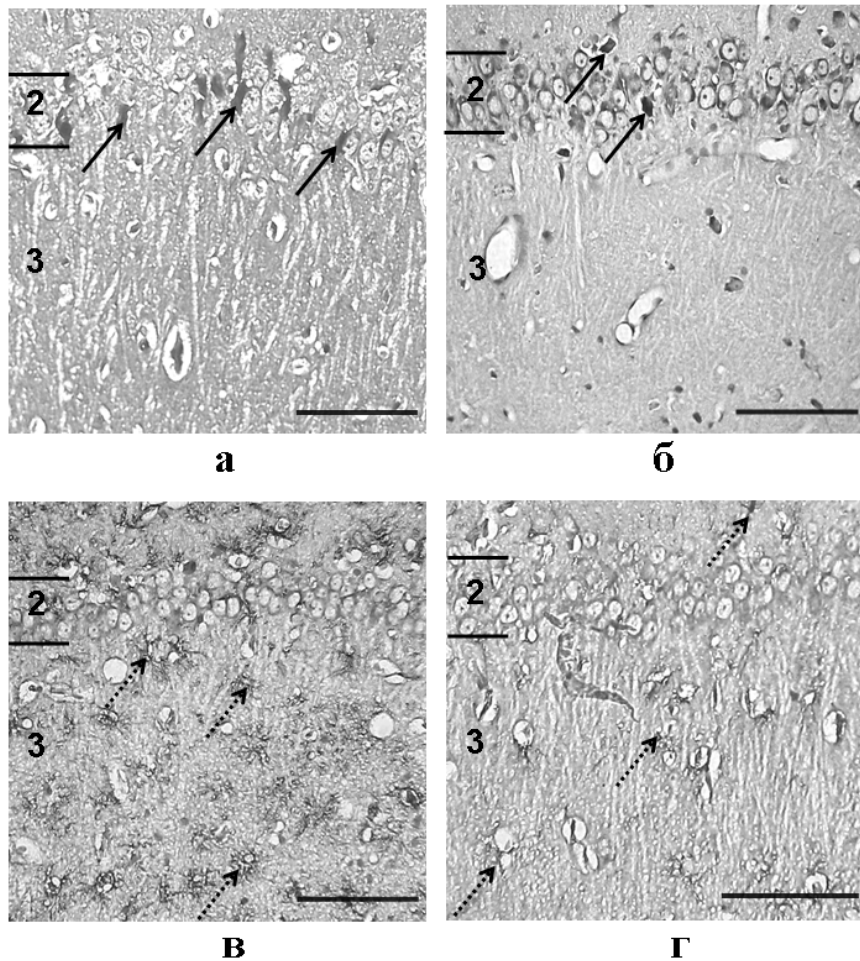


Рис. 2. СА1-зона гіпокампа: а, б – після ішемії (4 і 7 міс відповідно), в, г – після трансплантації (3 і 6 міс відповідно). 2 – пірамідальний шар, 3 – променистий шар. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Пунктирними стрілками позначені ГФКБ-позитивні клітини. Шкала – 50 мкм

шару, однак структура променистого шару наближалася до нормальної. Ширина променистого шару становила $432 \text{ мкм} \pm 108 \text{ мкм}$ (60 полів зору). Мікрогліальна інфільтрація була невираженою. У будові зубчастої звивини та СА4-зони гіпокампа порівняно з контролем суттєвих особливостей не виявлено.

Група ПТ3, 6 міс після ТФНТ. Пірамідальний шар тварин після трансплантації містив нормальні нейрони з лінійною щільністю $150 [128; 168] \text{ мм}^{-1}$ (див. рис. 2,г). У ділянках введення трансплантата спостерігали розрідження пірамідального шару, яке повністю нівелювалося на відстані 60–70 мкм від точки трансплантації. Структура нейропіля променистого шару відповідала нормальній, зі збереженням рівнобіжності волокон, ширина його становила $582 \text{ мкм} \pm 130 \text{ мкм}$ (145 полів зору). Ділянки мікровакуолізації поодинокі, мікрогліальна інфільтрація незначна.

У зубчастій звивині більшості тварин відмічали дегенерацію гранулярного шару внутрішнього плеча при практично інтактних зовнішньому плечі та пірамідальному шарі СА4-зони.

Кількість ГФКБ-позитивних клітин порівняно з групою ПТ2 була меншою, однак також відмічались їх скупчення у дегенерованому плечі зубчастої звивини та

в зоні введення трансплантата.

Порівняльний аналіз. Отримані при морфометричному аналізі пірамідального шару СА1-зони гіпокампа ряди значень лінійної щільності у групах ПІ1 і ПТ1 не задовольняли вимогам нормального розподілу. Тому для міжгрупового порівняння цих значень використовували непараметричний метод Манна–Уїтні. При попарному порівнянні відповідних груп після ішемії та після трансплантації (ПІ1–ПТ1, ПІ2–ПТ2 та ПІ3–ПТ3) лінійна щільність пірамідальних клітин та ширина променистого шару були достовірно вищими у тварин після трансплантації (таблиця).

При порівнянні значень лінійної щільності пірамідальних клітин СА1-зони гіпокампа між групами після ішемії відмічали достовірне збільшення цього показника протягом усього часу спостереження. Так, лінійна щільність із значення 4 [3; 9] в групі ПІ1 збільшувалася до 87 [72; 98] в групі ПІ2 ($U = 1248, U_p = 624, P < 1 \cdot 10^{-9}$) і до 134 [117; 154] в групі ПІ3 (порівняння ПІ2–ПІ3: $U = 52, U_p = 360, P = 1,24 \cdot 10^{-9}$). Аналогічно виявляли достовірне зростання лінійної щільності у групах тварин після трансплантації: із значення 23 [13; 49] в групі ПТ1 – до 132 [112; 154] у групі ПТ2 ($U = 206, U_p = 3960, P < 1 \cdot 10^{-9}$) і до 150 [128; 168] у групі ПТ3 (порівняння ПТ2–ПТ3: $U = 3315, U_p =$

Результати міжгрупового попарного порівняння значень лінійної щільності пірамідальних клітин та ширини променистого шару СА1-зони гіпокампа у щурів

Групи тварин	Лінійна щільність, мм^{-1}	Порівняння лінійної щільності, U-критерій Манна–Уїтні	Ширина променистого шару, мкм	Порівняння ширини променистого шару, критерій t Стьюдента
Контроль	198 [182; 208]		682±36	
ПІ1	4 [3; 9]	$U = 619$		
ПТ1	23 [13; 49]	$U_p = 2860$ $P < 1 \cdot 10^{-9}$	не проводили	не проводили
ПІ2	87 [72; 98]	$U = 235,$	390±59	$t = -9,75, t_{\text{крит.}} = 1,66$
ПТ2	132 [112; 154]	$U_p = 864$ $P = 4,9 \cdot 10^{-9}$	535±73	$P < 1 \cdot 10^{-9}$
ПІ3	134 [117; 154]	$U = 1414$	432±108	$t = -7,88, t_{\text{крит.}} = 1,65$
ПТ3	150 [128; 168]	$U_p = 1920$ $P = 0,012$	582±130	$P < 1 \cdot 10^{-9}$

4608, $P = 5,01 \cdot 10^{-4}$). Однак навіть через 7 міс після ішемії та через 6 міс після ТФНТ значення лінійної щільності були достовірно нижчими, ніж у контрольної групи (198 [1182; 208]): ПІЗ – контроль – $U = 210$, $U_p = 105$, $P = 9,71 \cdot 10^{-8}$; ПТЗ – контроль – $U = 836$, $U_p = 448$, $P = 3,46 \cdot 10^{-6}$.

Також спостерігали достовірне збільшення ширини променистого шару у тих тварин після ТГІ, де його вимірювання було можливим. Значення цієї ширини з 390 мкм \pm 59 мкм у групі ПІ2 зростало до 432 мкм \pm 108 мкм у групі ПІЗ ($t = -1,99$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $p = 2,47 \cdot 10^{-2}$). У тварин після ТФНТ збільшувалося значення з 535 мкм \pm 73 мкм у групі ПТ2 до 582 мкм \pm 130 мкм у групі ПТЗ ($t = -2,82$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $p = 2,62 \cdot 10^{-3}$). Але в групах ПІЗ та ПТЗ вони були достовірно нижчими, ніж у контрольній (682 мкм \pm 36 мкм): ПІЗ – контроль – $t = -15,17$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $P < 1 \cdot 10^{-9}$; ПТЗ – контроль – $t = -5,24$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $P = 2,18 \cdot 10^{-7}$.

У багатьох експериментальних роботах показано, що ішемічне ураження гіпокампа призводить до повного спустошення пірамідального шару СА1-зони внаслідок фагоцитозу загинувших нейронів гліальними клітинами, що особливо чітко виражено впродовж перших 30 діб [2, 12, 18]. Проведене у нашій роботі дослідження цитоархітекτονіки гіпокампа щурів підтверджує ці результати і засвідчує, що чотирисудинна оклюзія у щурів призводить до значних порушень у різних зонах гіпокампа, які у дорослих тварин проявляються протягом тривалого часу. Через 2 міс після оклюзії спостерігали виражену дегенерацію пірамідальних клітин зон СА1 і СА4, гомогенізацію та вакуолізацію променистого шару СА1-зони. Відомо, що пірамідальні клітини зон СА3, СА4 та гранулярні клітини зубчастої звивини гіпокампа значно стійкіші до гіпоксично-ішемічного ураження, ніж пірамідальні клітини зони СА1 [14, 17, 18]. Тому, ймовірно, виявлена дегенерація в СА4-зоні відбувається у пізніші строки, ніж

загибель пірамідальних клітин СА1-зони, і не пов'язана безпосередньо з ішемією. Враховуючи відсутність подібних змін у тварин після ТФНТ, дегенерація СА4-зони, можливо, відбувається протягом 2-го місяця після ішемії.

Оцінка у більш віддалені строки свідчить про поступове спонтанне відновлення структури цих шарів гіпокампа, однак і через 7 міс такі показники, як лінійна щільність клітин у пірамідальному шарі чи ширина променистого шару не сягають рівня контролю.

Уведення суспензії клітин фетальної нервової тканини за допомогою двобічної стереотаксичної трансплантації в СА1-зону гіпокампа щурів, що перенесли ТГІ головного мозку, мало позитивний вплив на відновлення морфології ураженого гіпокампа. Через 1 міс після ТФНТ виявлено перші ознаки відновлення у вигляді клітин з нормальною структурою у пірамідальному шарі та осередків нормальної будови променистого шару. Відсутність дегенерації пірамідальних клітин СА4-зони у тварин після трансплантації свідчить про нейропротекторний ефект ТФНТ. Надалі, протягом щонайменше 6 міс, під впливом трансплантації спостерігається достовірно динамічніше зростання показників лінійної щільності і ширини променистого шару в СА1-зоні гіпокампа.

Відомо, що в період ембріогенезу пірамідальні клітини СА1-зони диференціюються на 18–19-ту добу ембріонального розвитку (E18–E19), тоді як диференціація гранулярних клітин зубчастої звивини починається на E20–E21, а закінчується після народження [4]. Показано, що саме гомотопічна ТФНТ, яка містить СА1-пірамідальні клітини, позитивно впливає на перебіг розладів оперативної пам'яті, спричинених ішемією гіпокампа [12], і що нейрони реципієнта здатні реіннервувати трансплантовані фетальні пірамідальні клітини [11]. Також було встановлено, що

субгранулярна зона зубчастої звивини ссавців навіть у дорослому віці містить нервові стовбурові клітини і є осередком нейрогенезу [24]. Окрім того, гіпокампальні нервові стовбурові клітини щурів здатні диференціюватися в умовах відповідного мікрооточення у функціональні нейрони як *in vitro*, так і *in vivo* [23].

Отримані нами результати дають змогу припустити, що вплив ТФНТ на ішемізований гіпокамп може ґрунтуватися на кількох механізмах. По-перше, може іти безпосереднє заміщення загиблених пірамідальних нейронів у СА1-зоні гіпокампа із подальшим відновленням цитоархітектоніки ураженої зони. По-друге, може відбуватися міграція та диференціація трансплантованих нервових стовбурових/прогеніторних клітин у функціональні нейрони та вбудовування їх у нейрональні ланцюги гіпокампа. Використаний у цій роботі спосіб виділення СА1-зони з фетального мозку не давав змоги відділити її від зародкової зубчастої звивини. Тому існує досить висока ймовірність того, що трансплантована суспензія фетальної нервової тканини містила як пірамідальні клітини СА1-зони, так і нервові стовбурові/прогеніторні клітини зубчастої звивини. І, по-третє, можлива стимуляція власного нейрогенезу у субгранулярній зоні гіпокампа під впливом факторів росту, які у високих концентраціях містить фетальна нервова тканина. На користь цього свідчать характерні зміни у вигляді гіперпроліферації гранулярного шару зубчастої звивини. Через 2 міс після ішемії ці зміни спостерігались у тварин як після ТГІ, так і після ТФНТ з деяким переважанням у останніх проліферативного компонента. Наші результати збігаються з даними інших авторів про стимулювальний вплив транзиторної ішемії на нейрогенез у зубчастій звивині піщанок та приматів [13, 30]. Однак через 4 міс після ішемії ознаки стимуляції нейрогенезу явно переважали у тварин після трансплантації, що дає змогу

припускати тривалу його потенціацію під впливом ТФНТ.

Відомо, що клітини субгранулярної зони гіпокампа, здатні до проліферації та диференціювання у нейрони, експресують ГФКБ [21]. Виявлене у тварин після ТФНТ збільшення кількості ГФКБ-позитивних клітин переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини може свідчити як про інтенсивну проліферацію астроцитів реципієнта, так і про міграцію у цю зону трансплантованих клітин. Таким чином, донорські клітини, як і субгранулярні астроцити реципієнта можуть відновлювати популяцію нейронів внаслідок утворення нових нейронів із клітин-прогеніторів, а також активувати синаптогенез і нейрогенез продукуванням факторів росту та цитокінів. Відновлення характерної структури гіпокампа в постішемичному періоді може створювати сприятливі умови для нормальної функціональної активності його ланцюгів, а, отже, і сприяти відновленню втрачених функцій.

Таким чином, транзиторна глобальна ішемія головного мозку дорослих щурів, викликана 4-судинною оклюзією, спричиняє практично тотальну загибель пірамідальних клітин СА1-зони гіпокампа та викликає гіперпроліферацію у гранулярному шарі зубчастої звивини. Такі зміни чітко проявляються через 2 міс після ішемії. Надалі спостерігається спонтанне поступове відновлення структури СА1-зони та нормалізація стану зубчастої звивини. Проте і через 7 міс після ішемії лінійна щільність клітин у пірамідальному шарі та ширина променистого шару не сягають контрольних значень.

Пізня, через 30 діб після ішемії, трансплантація суспензії фетальної нервової тканини, що містить клітини СА1-зони та зародкової зубчастої звивини, спричиняє тривале стимулювання репаративних процесів у гіпокампі та прискорює відновлення його цитоархітектоніки.

А.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.И. Цымбалюк

**ВЛИЯНИЕ ПОЗДНЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ФЕТАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА
ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ГИППОКАМПА В
ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ
ТРАНЗИТОРНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

Исследовано влияние трансплантации фетальной нервной ткани (ФНТ) на восстановление структуры гиппокампа ишемизированных крыс. Транзиторную глобальную ишемию (ТГИ) головного мозга крыс возрастом 13,2 мес ± 2,4 мес вызывали путем 20-минутной 4-сосудистой окклюзии. Суспензию ФНТ получали из СА1-зоны и зачаточной зубчатой извилины гиппокампов плодов крыс 18–19-х суток эмбрионального развития. ФНТ трансплантировали стереотаксически в СА1-зону гиппокампа животных через 30 сут после ТГИ. Линейную плотность пирамидальных клеток, ширину лучистого слоя СА1-зоны, морфологию зубчатой извилины и СА4-зоны изучали на светооптическом уровне в срезах гиппокампов через 2, 4 и 7 мес после ТГИ и через 1, 3 и 6 мес после трансплантации ФНТ. Установлено, что поздняя трансплантация ФНТ достоверно ускоряет восстановление цитоархитектоники гиппокампа в течение продолжительного периода после ТГИ головного мозга крыс.

Ключевые слова: фетальная нервная ткань, глобальная ишемия головного мозга, стереотаксическая трансплантация, гиппокамп.

**O.V. Garashchuk, O.M. Tsupikov,
V.I. Tsymbaliuk**

**LONG-TERM EFFECT OF FETAL NEURAL
TISSUE LATE GRAFTING ON HIPPOCAMPUS
CYTOARCHITECTURE AFTER TRANSIENT
GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS**

The effect of fetal neural tissue (FNT) grafting on regeneration of hippocampus structure has been investigated in postischemic rats. Transient global cerebral ischemia was induced by 20-min four-vessel occlusion in 13.2±2.4-month-old rats. FNT suspension was prepared from hippocampal CA1 area and primordial dentate gyrus of E18-E19 rat fetuses. 30 days after TGI, FNT was stereotactically transplanted into CA1 area of ischemic animals. Linear density of CA1 pyramidal neurons, stratum radiatum width, CA4 and dentate gyrus morphology were studied in hippocampal slices by light microscopy 2, 4 and 7 months after TGI and 1, 3 and 6 months after FNT grafting. It has been shown, that late FNT grafting provides significant and prolonged potentiation of a hippocampal cytoarchitecture recovery after TGI in rats.

Key words: fetal neural tissue, forebrain global ischemia, stereotaxic grafting, hippocampus.

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv;

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваль И.Н., Саркисов Г.Т., Гамбарян Л.С. Септо-гиппокампальная система и организация поведения. – Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1986. – 127 с.
2. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Осадченко І.О., Цупиков О.М., Півнева Т.А. Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку // Укр. неврол. журн. – 2006. – №1. – С. 86–92.
3. Цупиков О.М., Півнева Т.А., Поддубна А.О., Кирик В.М., Кучук О.В., Бутенко Г.М., Скибо Г.Г. Міграція та диференціація трансплантованих фетальних нейрогенних клітин у мозку ішемізованих тварин // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №4. – С. 41–49.
4. Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography // J. Comp. Neurol. – 1980. – 190, №1. – P. 87–114.
5. Bird C.M., Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing // Nat. Rev. Neurosci. – 2008. – 9, №3. – P. 182–194.
6. Bjurklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders // Nat. Neurosci. – 2000. – 3, №6. – P. 537–544.
7. Blackstad T.W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination // J. Comp. Neurol. – 1956. – 105, №3. – P. 417–537.
8. Braak H., Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Suppl. – 1998. – 53, №1. – P. 127–140.
9. Caronna J.J., Finklestein S. Neurological syndromes after cardiac arrest // Stroke. – 1978. – №9. – P. 517–520.
10. Englund U., Bjorklund A., Wictorin K., Lindvall O., Kokaia M. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – 99, №26. – P. 17089–17094.
11. Field P.M., Seeley P.J., Frotscher M., Raisman G. Selective innervation of embryonic hippocampal transplants by adult host dentate granule cell axons // Neuroscience. – 1991. – 41, №2-3. – P. 713–727.
12. Hodges H., Sowinski P., Fleming P., Kershaw T.R., Sinden J.D., Meldrum B.S., Gray J.A. Contrasting effects of fetal CA1 and CA3 hippocampal grafts on deficits in spatial learning and working memory induced by global cerebral ischaemia in rats // Neuroscience. – 1996. – 72, №4. – P. 959–988.
13. Liu J., Solway K., Messing R.O., Sharp F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils // J. Neurosci. – 1998. – 18, №19. – P. 7768–7778.
14. Nitatori T., Sato N., Waguri S., Karasawa Y., Araki H., Shibana K., Kominami E., Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // J. Neurosci. – 1995. – 15, №2. – P. 1001–1011.

15. Olstorn H., Moe M.C., Ruiste G.K., Bueters T., Langmoen I.A.. Transplantation of stem cells from the adult human brain to the adult rat brain // *Neurosurgery*. – 2007. – **60**, №6. – P. 1089–1098.
16. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – New York: Acad. Press, 1982. – 155 p.
17. Pulsinelli W.A., Brierley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat // *Stroke*. – 1979. – **10**, №3. – P. 267–272.
18. Pulsinelli W.A., Brierley J.B., Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia // *Ann. Neurol.* – 1982. – **11**, №5. – P. 491–498.
19. Schwerdtfeger W. K. Structure and fiber connections of the hippocampus, a comparative study. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, vol. 83. – Berlin, New York: Springer-Verlag, 1984. – 75 p.
20. Scoville W.B., Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. – 1957. – №20. – P. 11–21.
21. Seri B., Garcna-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // *J. Neurosci.* – 2001. – **21**, №18. – P. 7153–7160.
22. Shetty A.K., Zaman V., Hattiangady B. Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy // *Ibid.* – 2005. – **25**, №37. – P. 8391–8401.
23. Song H.J., Stevens C.F., Gage F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons // *Nat Neurosci.* – 2002. – **5**, №5. – P. 438–445.
24. Taupin P., Gage F.H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – **69**, №6. – P. 745–749.
25. Turner D.A., Shetty A.K. Clinical prospects for neural grafting therapy for hippocampal lesions and epilepsy // *Neurosurgery*. – 2003. – **52**, №3. – P. 632–644.
26. van Strien N.M., Cappaert N.L., Witter M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – **10**, №4. – P. 272–282.
27. Virley D., Ridley R.M., Sinden J.D., Kershaw T.R., Harland S., Rashid T., French S., Sowinski P., Gray J.A., Lantos P.L., Hodges H. Primary CA1 and conditionally immortal MHP36 cell grafts restore conditional discrimination learning and recall in marmosets after excitotoxic lesions of the hippocampal CA1 field // *Brain*. – 1999. – **122**, №12. – P. 2321–2335.
28. Volpe B.T., Pulsinelli W.A., Tribuna J., Davis H.P. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia // *Stroke*. – 1984. – **15**, №3. – P. 558–562.
29. Wagner A.P., Schmoll H., Badan I., Platt D., Kessler C. Brain plasticity: to what extent do aged animals retain the capacity to coordinate gene activity in response to acute challenges // *Exp. Gerontol.* – 2000. – **35**, №9–10. – P. 1211–1227.
30. Yamashima T., Tonchev A.B., Borlongan C.V. Differential response to ischemia in adjacent hippocampal sectors: neuronal death in CA1 versus neurogenesis in dentate gyrus // *Biotechnol. J.* – 2007. – **2**, №5. – P. 596–607.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: Omy@bigmir.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.11.2009*